

## C. DIFFICILE TOXINS A+B MonlabTest®

MO-076011 20 TESTS

One-step immunochromatographic test for the differential detection of toxin A and toxin B from *C. difficile* in faeces



For *in vitro* use only. Store at 2 - 30°C.

### INTENDED USE

*C. difficile* toxins A+B MonlabTest chromatographic immunoassay provides a procedure for a qualitative detection of Clostridium difficile toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB) in two separate bands. A positive band of either toxin is a sign of an underlying Clostridium difficile infection (CDI), which should be taken into consideration by the clinician.

Unlike other immunoassay systems (ELISA and rapid tests) that only allow detection of TcdA and TcdB in combination and without any differentiation between the two, the *C. difficile* toxins A+B MonlabTest allows you to run a single assay with a single strip that differentiates between both of the toxins using two separated bands - a red band below the blue control band when TcdA is present, and another red band above the control band when TcdB is in the sample (see Fig. 1).

The test is based on the immunological capture of coloured microparticles during their passage along a membrane on which specific monoclonal antibodies against TcdA and TcdB have been immobilised at two separated locations.

### SUMMARY

#### Presumptive diagnosis of Clostridium difficile infection (CDI)

*C. difficile* produces two different toxins that constitute the essential virulence factors for CDI induction. Recent investigations<sup>1,2</sup> have proven that each of the two alone will induce disease in hamsters.

*C. difficile* infection is considered responsible for approximately 25% of the diarrhoea incidents related to the consumption of antibiotics such as clindamycin, second and third generation cephalosporins, gyrase-inhibitors, ampicillin or amoxicillin. In addition to the diarrhoea symptoms, the disease can lead to pseudo-membranous colitis (PMC), requiring urgent treatment with antibiotics effective against *C. difficile* (metronidazole / vancomycin) and which, without treatment, may severely compromise the life of the patient. CDI mortality can be as high as 6% to 30%, particularly when the patient suffers from PMC. Patients suffering from CDI induced by previous treatment can lead to an increased hospital stay of 6-10 days at an additional cost of 6000-8000 euros<sup>3</sup>.

#### C. difficile description

*Clostridium difficile* is an anaerobic, gram-positive, spore-forming bacteria that is carried by approximately 5% of the healthy population. Following hospitalisation, the carrier rate climbs to approximately 30%.

Children are colonised by *C. difficile* early after birth, but they do not appear to suffer any clinical symptoms despite intensive investigations. The current discussion suggests a lack of enteric receptors for the toxins or differences in faecal pH in children that prevent toxin activity.

As previously mentioned, *C. difficile* can produce different toxins<sup>4</sup>:

- **Toxin A (TcdA)** (308 kDa) is called an enterotoxin given that it can induce full symptoms in the hamster animal model. TcdA also displays high cytotoxicity but only on specific TcdA sensitive cells such as HT-29<sup>5</sup>.
- **Toxin B (TcdB)** (279 kDa) is classified as a cytotoxin. In the majority of cells cultured in laboratories (e.g. Vero, CHO or HeLa) it is about 1,000 times more potent than toxin A. The TcdB amino acid sequence varies between different strains<sup>6</sup>.

#### TcdA/TcdB detection patterns

The following *C. difficile* strains can be identified based on the production of toxins:

- **Non-toxicogenic strains** are non-pathogenic and lack TcdA and TcdB production as well as production of the binary toxin.
- **TcdA+ / TcdB+ strains** are the most common CDI inducing strains of which ribotypes 001, 014 and 078 are the most prevalent in Europe<sup>7</sup>.
- **TcdA- / TcdB+ strains** were first identified by Depitre et al. in Belgium<sup>8</sup>. They are considered pathogenic despite not producing toxin A<sup>9</sup>. Ribotype 017 strains belong to this group and were responsible for various endemic outbreaks in North America.
- **TcdA+ / TcdB- strains** can be identified directly in stool samples with the *C. difficile* toxins A+B MonlabTest due to provides a simple, fast and separate detection of toxin A and toxin B in a single test. Very few isolates of these strains have been found until now. Recent results show that TcdB mutant *C. difficile* strains still induce CDI in hamsters owing to the production of toxin A<sup>2</sup>. These results appear to indicate the presence of these strains in clinical samples.

### BASIC PRINCIPLES OF THE TEST

The *C. difficile* toxins A+B MonlabTest employs a combination of:

- 1) Red latex particles conjugated to a specific toxin A antibody that cooperates with another antibody specific for toxin A and that is located on the membrane, below the control band,
- 2) Other red latex particles conjugated to a specific toxin B antibody that cooperates with another specific toxin B antibody that is located on the membrane, above the control band,
- 3) Blue latex particles conjugated to an antigen recognised by an antibody specific for that antigen and bound to the membrane, serving as the control band test.

To run the test, the sample is first treated with a sample diluent buffer (provided in the kit) that extracts the toxins from the stool matrix. Following extraction, an aliquot of the supernatant needs to be added to the test strip followed by a 15 minutes wait.

When the extract flows through the test membrane, the coloured particles begin to migrate. In the event of a positive sample, the specific antibodies on the membrane will capture antigen-covered coloured particles.

The pattern of lines obtained after 15 minutes of incubation at room temperature are used to interpret the result (see Fig.1).

### MATERIAL PROVIDED

- 20 cassettes
- 20 vials with diluent (1.5mL)
- Disposable plastic pipettes
- Instructions for use

### MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT

- Vortex
- Timer

### PRECAUTIONS

1. Patient samples (faeces) should be handled with care as they may contain infectious agents. All the necessary protections should be used throughout handling (disposable gloves, goggles, laboratory coat and others).
2. The sample diluent buffer contains Sodium Azide as an antimicrobial agent. Avoid direct contact with the skin and mucous membranes. Dispose of appropriately. The buffer should not be used if there are signs of contamination or precipitation.
3. Do not eat, drink, smoke, store or prepare food in areas where the reagents and the samples are handled.
4. Once the work has been concluded, remove the gloves and first disinfect your hands with alcoholic disinfectant. Secondly, wash your hands with soap. Finally, the sink that has been used needs to be decontaminated with sporocidal disinfectants, as the *C. difficile* spores are not eliminated with alcohol.
5. Do not exchange components between kits with different lot numbers.
6. If the test is stored refrigerated, allow kit components and stool samples to reach room temperature before use, as cold reagents and/or samples may reduce test performances. About 20-30 minutes are usually sufficient for reaching room temperature.
7. All reagents are for *in vitro* use only.
8. Do not use kit components beyond their expiry date.
9. In case the primary packaging is damaged (aluminium pouch or diluent buffer vial) the product should not be used even though none of the components have been damaged.
10. It is very important to add the correct volume of extracted sample to the reactive device. If the volume is lower than indicated, chromatography may not occur because the sample may not reach the reaction area. If higher volumes are used, brown lines may appear instead of red or blue ones.
11. All products are for single use only and should be discarded according to current legislation.
12. Do not use the test if any coloured lines appear in the result area prior to performing the test.
13. It is critical to collect the correct sample quantity: approximately **110 mg** of a **solid sample** (a **small ball of 5 mm in diameter**). If the **sample is semi-liquid** (unable to take it with a pipette), take a sample amount so that it completely **covers the grooves of the stick** attached to the vial cap and **110 µl** of a liquid sample (**4 drops** if the disposable pipettes included in the kit are used). These quantities are extracted in the sample diluent supplied with the vials provided in the kit. An excess of sample in relation to the amount of buffer added prevents the chromatography from running correctly; this is especially critical in the case of solid samples, since it is harder to obtain an appropriate quantity.
14. Do not discard the external box of the kit until its content has been totally used. The external box contains essential information regarding the EC marking and lotification.

### STORAGE AND STABILITY

*C. difficile* toxins A+B MonlabTest can be stored at any temperature between 2 and 30°C.

Its expiry date is printed on the tube or on the aluminium wrap.

### SAMPLES

- This test is designed to analyse liquid or semi-liquid stool samples. Solid samples may be analysed, but it is unusual given that the leading symptom of *C. difficile* infection is diarrhoea.
- Do not use samples that have been collected in means of conveyance or to which enrichment media / preserving agents have been added (e.g. formalin, SAF, PVA or similar) as they may interfere with the test.
- The analysis of untreated fresh samples is recommended. If preservation is needed, they should not be stored in the refrigerator (+2-8°C) for longer than 1 to 2 days. For longer storage, samples must be frozen at -20°C, however please bear in mind that some samples turn negative when they have been frozen.
- Pay special attention when analyzing hemorrhagic samples as they often give false positive results when the blood content is high. An indicator of this destabilization of the test is usually the alteration of the colour in the control band (tends to show a purple or dark blue colour).
- Ensure that frozen samples have completely defrosted and reached room temperature prior to proceeding with their analysis.
- Avoid repeatedly freezing and thawing the stool samples as the integrity of the toxins may suffer.

### STOOL SAMPLES PREPARATION

**General remark:** all the necessary protections should be used throughout the test procedure due the handling of infectious samples. Once finished, do not forget to comply with the hygiene procedures detailed in point 4 of the "Precautions" section.

The sample diluent buffer is the same as for the MO-076012 *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest.

The protocol for the preparation of stool samples is as follows:

1. Homogenize previously the sample to get an aliquot as much representative as possible.



- Unscrew the cap from the vial with caution in order not to spill the sample diluent buffer. With **solid samples**, take with the stick attached to the vial cap an approximate amount of **110 mg** of faeces (a small portion of **5 mm in diameter**). If the sample is **semi-liquid** (unable to take it with a pipette), take a sample amount so that it completely **covers the grooves of the stick** attached to the vial cap. With **liquid samples**, take a volume of **110 µl (4 drops)** if the disposable pipettes included in the kit are used).
- Carefully add the sample into the vial containing the dilution buffer. Screw the cap well and shake vigorously to ensure a homogeneous mixture

## PROCEDURE

- Take the reaction device out of its aluminium pouch. Discard the desiccant as it only functions as to preserve the test from any excess of humidity.
- Put the vial upside down and add **3 drops** to the sample area of the reaction device (round window marked with an arrow).
- Wait for **15 minutes** and read the results.

## INTERPRETATION OF THE RESULTS

The five strips shown in Fig. 1 exemplify the various results that can be obtained using the *C. difficile* toxins A+B MonlabTest. There are three different coloured bands:

- Blue band:** the control band that indicates a correct performance of the test.
- Upper red band:** TcdB positive sample.
- Lower red band:** TcdA positive sample.

The blue band (control) should always appear. The additional appearance of any red band in the strip indicates the presence of *C. difficile* that produces TcdA and/or TcdB in the analysed sample.

- Strip 1:** NEGATIVE result: the sample does not contain *C. difficile* or it contains a strain that does not produce TcdA/TcdB. A single **BLUE** horizontal band appears within the central area of the reactive device (in the Simple format it is aligned with the letter "C" marked on the cassette). This is the control band and it should always appear as an indication of the chromatography running smoothly.
- Strips 2-4:** POSITIVES results:
  - Strip 2:** Detection of TcdA: a **BLUE** (control band) and a **RED** band appear just below the control band aligned with the letter "T1" marked on the cassette. The intensity depends on the concentration of toxin A in the sample.
  - Strip 3:** Detection of TcdB: a **BLUE** (control band) and a **RED** band appear just above the control band aligned with the letter "T2" marked on the cassette. The intensity depends on the concentration of toxin B in the sample.
  - Strip 4:** Detection of both TcdA and TcdB: a **BLUE** (control band) and two **RED** bands (one above [TcdB] and one below [TcdA] the control band).
- Strip 5:** INVALID result: the blue control band does not appear, or the blue colour of this band is clearly altered (very dark blue or a purple colour), also nonspecific colours in the positive bands (different from red) are invalid results. In general, any colour combination different from those indicated in 1-4 strips indicates an anomalous test performance. Possible reasons are:
  - some reagents have got damaged or the test has expired.
  - the sample was not prepared according to the instructions of use.
  - high blood content in the sample.

In the event of an invalid result it is recommended that another test is run, strictly following the protocol described in this manual. For blood samples, it is advisable the use of an alternative technique because the problem of destabilization does not usually depend on the strip but of the sample matrix. Other commercial rapid tests gave similar results with these bloody samples.

Any line appearing after the standard 15 minutes reaction time is of NO diagnostic value.

NOTE: The final and definitive diagnosis CDI/PMC is established by the clinician. This test only detects TcdA/TcdB in a sample but does not constitute a case to confirm whether a person has CDI.

Strip 1	Strip 2	Strip 3	Strip 4	Strip 5
				
TcdB- TcdA-	TcdB- TcdA+	TcdB+ TcdA-	TcdB+ TcdA+	Invalid test

Fig. 1: Pattern of possible results

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- C. difficile* toxins A+B MonlabTest analyses liquid or semi-liquid human stool samples; solid samples may be used; however, the test has not been optimised for their use since, in rare occasions, toxins sequestration phenomena have been observed with such solid matrices.
- This test is qualitative and not quantitative, although the intensity of the positive bands is associated with the quantity of toxins that are detected in the stool sample.
- Over 200 stool samples were evaluated to ensure the correct performance of the test. The correlation of the results with other techniques (ELISA and Cytotoxicity) was good. However, this study does not exclude interferences in the performance of the tests with other stool samples.
- Weak signals may be due to excessively low amounts of sample. In the event of this occurring, the test should be repeated with a greater amount of sample whilst maintaining the recommended sample diluent ratio (see "Sample preparation" section).
- An excess of sample can significantly slow down the development of the test or even prevent the test from running (control band remains invisible). In the event of this occurring, the test should be repeated with a reduced sample amount. This is particularly relevant in the analysis of solid samples.
- A negative result does not fully exclude the possibility of infection with a *C. difficile* (CDI). The test result must be interpreted in relation to the clinical symptoms of the patient. In addition, it is important to keep in mind that toxins are fragile molecules that can be easily degraded, for example owing to inappropriate storage of the sample or the presence of inhibitors. Under these conditions, toxin concentration may be below the test detection limit (see "Analytical Sensitivity" section).
- A positive result obtained from solid samples must be interpreted with a great amount of caution. In principle, diarrhoea is the leading symptom of *C. difficile* (CDI) infection CDI, and a solid stool implies an absence of diarrhoea. The person performing the test must provide the clinician with information on the nature of the sample. This, in combination with the patient's medical history, will allow the clinician to establish the most accurate diagnosis possible.
- A certain degree of cross-reaction has been observed with stool samples that are strongly positive for *Entamoeba histolytica*. The reaction was negative when using a preparation of the isolated parasite (without stool matrix). Other ELISA and rapid tests that are available on the market yielded similar results for these samples.
- It is observed that faecal samples with a high blood content may interfere negatively with the test. In this case, specificity problems may appear with *C. difficile* negative samples. This destabilization of the test is often accompanied by an alteration in the colour of the control band; a purple or dark blue colour appears instead of the expected light blue (see images in "Interpretation of the results" section).
- C. difficile* colonisation rates of up to 50% have been reported in infants. A high rate has also been reported in cystic fibrosis patients. Normally, these two groups of patients remain asymptomatic and do not require specific treatment. These positive results that are of no clinical significance should be treated with caution as affected patients do not require treatment for *C. difficile* infection.

## ANALYTICAL SENSITIVITY

In order to determine the sensitivity of the *C. difficile* toxins A+B MonlabTest toxins A and B from tgc BIOMICs were used diluted in the sample diluent buffer of this test. Most manufactured batches detect a concentration of 0.75 ng/mL of both toxins.

## DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The average values of sensitivity and specificity for the *C. difficile* toxins A+B MonlabTest obtained from all the evaluations made with the test are:

Sensitivity: 97.4 %  
Specificity: 96.1 %

*C. difficile* toxins A+B MonlabTest shows an excellent performance with sensitivity and specificity values above 95%.

Two of the evaluations performed with the test are showed below:

### A. External Evaluation:

*C. difficile* toxins A+B MonlabTest was evaluated at a Spanish hospital by measuring a total of 150 negative samples and 44 positive samples according to the reference technique, the Cytotoxicity. All samples were fresh.

The results obtained were:

Sensitivity: 92.5 %  
Specificity: 95.5 %

### B. Internal Evaluation

*C. difficile* toxins A+B MonlabTest was evaluated internally by measuring 242 negative samples and 105 positive samples according to the Cytotoxicity developed at the place of origin of the samples (different Spanish hospitals). All samples analysed were frozen. The results obtained were the follows:

Sensitivity: 99.0 %  
Specificity: 96.3 %

## REPEATABILITY

Purified toxins A and B were used to design a sensitivity curve to measure the sensitivity of the *C. difficile* toxins A+B MonlabTest in different conditions. Dilutions were two-fold and the samples were assayed by the same person in triplicate during a single session. The results differed by less than a factor of 2 indicating a high accuracy of the test.



## REPRODUCIBILITY

**INTER-DAY PRECISION:** A sensitivity curve was measured with the same lot of *C. difficile* toxins A+B MonlabTest on four different days. The results were very reproducible (the same level of sensitivity is obtained for both TcdA and TcdB over the four measurement days).

**INTER-OPERATOR PRECISION:** Five people with no prior training measured a sensitivity curve in duplicate. Differences were observed in the stronger curve dilutions (weaker signals), never exceeded a factor of 2.

**INTER-LOT PRECISION:** Three different lots were used to measure the sensitivity curve in duplicate. The analysis was performed by a single person on the same day. Differences of a dilution factor of 2 were appreciated, which are acceptable and tolerable for the test that was carried out.

The differences found in the "Reproducibility" sections are acceptable for this qualitative immunochromatographic test due to the inherent variability associated to this technique.

## HOOK EFFECT

Several publications indicate that in the case of severe *C. difficile* infections, the highest concentration of toxins found in faeces is around 112 ng/mL<sup>10</sup>. To evaluate the effect of a very high concentration of toxins, values well above those that can be found among the population, affected by CDI, concentrations of toxin A and toxin B up to 5000 ng/mL were measured with the test. This concentration is about 400 times the LPC test for toxin A (12.5 ng/mL), about 1500 times the LPC test for toxin B (3 ng/mL) and about 40 times the highest concentration of toxins found in faeces from patients. No decrease in the intensity of the positive signals was observed.

## INTERFERING SUBSTANCES

The substances indicated in the below table, at the specified concentration, did not interfere with the results of the test when they were added to stool samples (positive and negative ones):

Racecadotril	5% (p/v)	Ibuprofen	20% (p/v)
Cimetidine	10% (p/v)	Acetylsalicylic acid	30% (p/v)
Loperamide	5% (p/v)	Edulcorant	5% (p/v)
Metronidazole	10% (p/v)	Palmitic acid	40% (p/v)
Omeprazole	3% (p/v)	Barium Sulfate	5% (p/v)
Ampicillin	15% (p/v)	Mucin	5% (p/v)

## CROSS-REACTIVITY

This study was developed in two different places:

- MONLAB:** *C. difficile* toxins A+B MonlabTest was evaluated against strongly positive samples for the following microorganisms:

*Adenovirus - Rotavirus - Norovirus - Astrovirus - Helicobacter pylori - Entamoeba histolytica - Giardia lamblia - Cryptosporidium parvum.*

A certain degree of cross-reaction was observed with strongly positive samples for *Entamoeba histolytica* (see point 8 in the "Limitations of the Procedure" section).

- NATIONAL HOSPITAL CENTER (España):** *C. difficile* toxins A+B MonlabTest was evaluated against different micro-organisms likely to be present in the intestinal tract at any time in a sufficiently high concentration. Tests were carried out on bacterial suspensions at a concentration of 10<sup>8</sup> cfu/mL. *C. difficile* toxins A+B MonlabTest showed no cross reactivity with any of the micro-organism listed below:

*Aeromonas caviae, Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus spp, Bacteroides nordii, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium cadaveris, Clostridium perfringens, Clostridium sordellii, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli 1, Escherichia coli 2, Klebsiella pneumoniae, Lactobacillus gossneri, Listeria monocitogenes, Plesiomonas shigelloides, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enteritidis, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, Shigella dysenteriae, Shigella flexnerii, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica.*

## REFERENCES

- Lyras O, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN and Rood JI. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature. Apr 2009, Vol: 458(7242) pp: 1176-1179.
- Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A and Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature. Oct 2010, Vol: 467(7316) pp: 711-713.
- Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S and Gastmeier P. Costs of nosocomial *Clostridium difficile* associated diarrhoea. J Hosp Infect. Sep 2008, Vol: 70(1) pp: 15-20.
- Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I, Lyster DM, Popoff MR, Rood JI, Sonenshein AL, Thelestam M, Wren BW, Wilkins TD and von Eichel-Streiber C. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. J Med Microbiol. Feb 2005, Vol: 54(Pt 2) pp: 113-117.
- Tucker KD, Carrig PE and Wilkins TD. Toxin A of *Clostridium difficile* is a potent cytotoxin. J Clin Microbiol. May 1990, Vol: 28(5) pp: 869-871.
- Soehn F, Wagenknecht-Wiesner A, Leukel P, Kohl M, Weidmann M, van Eichel-Streiber C and Braun V. Genetic rearrangements in the pathogenicity locus of *Clostridium difficile* strain 8864-implications for transcription, expression and enzymatic activity of toxins A and B. Mol Gen Genet. May 1998, Vol: 258(3) pp: 222-232.
- Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E and Poxton I. European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect. Nov 2007, Vol: 13(11) pp: 1048-1057.
- Depitre C, Delmee M, Avesani V, L'Haridon R, Roels A, Popoff M and Corthier G. Serogroup F strains of *Clostridium difficile* produce toxin B but not toxin A J Med Microbiol. Jun 1993, Vol: 38(6) pp: 434-441.

- Drudy D, Harnedy N, Fanning S, Hannan M and Kyne L. Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. Infect Control Hosp Epidemiol. Aug 2007, Vol: 28(8) pp: 932-940.
- Alex B. Ryder, Ying Huang, Haijing Li, Min Zheng, Xiaobo Wang, Charles W. Stratton, Xiao Xu and Yi-Wei Tang. Assesment of *Clostridium difficile* infections by quantitative detection of TcdB toxin by use of a real-time cell analysis system. Journal of Clinical Microbiology, Nov 2010, pp: 4129-4134.

## PRESENTATION SYMBOLS USED FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS

	Manufactured by		For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Do not re-use		Please read pack insert
	Contains sufficient for <n> tests		Dry storage
	Catalogue number		Store at
	Lot number		Expiry date
	This product fulfils the requirements of Directive 98/79/EC on <i>in vitro</i> diagnostic medical devices		Dilution buffer



## C. DIFFICILE TOXINS A+B MonlabTest®

MO-076011 20 TESTS

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección diferencial de la toxina A y la toxina B de *C. difficile* en heces



Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*. Conservar a 2 - 30°C.

### USO PREVISTO

El inmunoensayo cromatográfico *C. difficile* toxins A+B MonlabTest es un procedimiento para la detección cualitativa, en bandas independientes, de la toxina A (TcdA) y de la toxina B (TcdB) de *Clostridium difficile* en heces humanas. Una señal positiva en cualquiera de las dos bandas de las toxinas proporciona un buen indicio de que podamos estar ante una infección por *Clostridium difficile* (CDI) que debería ser tenida en consideración por el clínico.

A diferencia de otros inmunoensayos del mercado (ELISA y test rápidos) que sólo permiten la detección conjunta de TcdA y TcdB, sin diferenciarlas en ningún caso, el test *C. difficile* toxins A+B MonlabTest permite, haciendo uso de un solo ensayo, diferenciar la presencia de ambas toxinas utilizando dos bandas separadas, una banda roja debajo de la banda azul de control que detecta la presencia de TcdA y otra banda de color rojo encima de la banda azul de control que detecta la presencia de TcdB en la muestra (ver Fig. 1).

El test está basado en la captura inmunológica de micropartículas coloreadas durante su paso a través de una membrana sobre la que se han inmovilizado, en posiciones separadas, anticuerpos monoclonales específicos frente a TcdA y TcdB.

### RESUMEN

#### Diagnóstico de infección por *Clostridium difficile* (CDI)

*C. difficile* produce dos toxinas diferentes que constituyen los factores de virulencia esenciales para desarrollar una CDI. Investigaciones recientes<sup>1,2</sup> han demostrado que cada una de las dos toxinas por sí solas pueden inducir la enfermedad en hámster.

Se considera que *C. difficile* es el responsable de aproximadamente un 25% de las diarreas relacionadas con el consumo de antibióticos entre los que se encuentran la clindamicina, segunda y tercera generación de cefalosporinas, inhibidores de girasa, ampicilina, amoxicilina, ... Además de los síntomas diarreicos, la enfermedad puede derivar en colitis pseudomembranosa (PMC) que necesita urgentemente un tratamiento con antibióticos eficaces frente a *C. difficile* (metronidazol /vancomicina) ya que puede llegar a comprometer la vida del individuo. La mortalidad asociada a CDI puede ir desde el 6% hasta el 30%, sobre todo si el paciente sufre PMC. La CDI inducida por tratamiento previo con antibióticos puede suponer una estancia en el hospital de 6-10 días con los consiguientes gastos adicionales que pueden alcanzar los 6000-8000 euros<sup>3</sup>.

#### Descripción de *C. difficile*

*Clostridium difficile* es una bacteria anaerobia grampositiva, con capacidad de formar esporas, presente de manera asintomática hasta en un 5% de la población sana. A causa de las hospitalizaciones, la tasa de portadores puede elevarse hasta un 30%.

Los niños suelen estar colonizados por *C. difficile* poco después de nacer, pero no tienden a desarrollar cuadros clínicos. Las investigaciones más recientes apuntan a que esto puede ser debido a la falta de receptores para las toxinas en los enterocitos o bien a que el pH fecal del niño es diferente al del adulto e impide la acción de las toxinas.

Como se ha comentado previamente, *C. difficile* puede producir dos toxinas diferentes<sup>4</sup>: la toxina A (TcdA) (308 kDa) denominada enterotoxina debido a que esta toxina puede inducir todos los síntomas en modelos de hámster. TcdA también llega a mostrar una elevada citotoxicidad pero sólo en células específicas que son especialmente sensibles a ella como las HT-29<sup>5</sup>.

La toxina B (TcdB) (279 kDa) clasificada como citotoxina. En la mayoría de las células cultivadas en laboratorio (como Vero, CHO, HeLa, etc.) es aproximadamente 1000 veces más potente que la toxina A. La secuencia de aminoácidos de TcdB varía entre las distintas cepas<sup>6</sup>.

#### Patrones de detección TcdA / TcdB

Respecto a la producción de estas dos toxinas, las cepas de *C. difficile* se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- Cepas no-toxigénicas: no son patógenas y carecen de la producción de TcdA y TcdB así como de la toxina binaria.
- Cepas TcdA+ TcdB+: son las cepas patógenas más comunes que inducen CDI de entre las cuales los ribotipos 001, 014, 027 y 078 son los más frecuentes en Europa<sup>7</sup>.
- Cepas TcdA- TcdB+: fueron identificadas por primera vez por Depitre et al. en Bélgica<sup>8</sup>. Se las considera patógenas a pesar de no producir la toxina A<sup>9</sup>. Entre estas cepas se encuentra el ribotipo 017, responsable de varios brotes endémicos en Norte América.
- Cepas TcdA+ TcdB-: estas cepas pueden ser identificadas directamente a partir de la muestra fecal con *C. difficile* toxins A+B MonlabTest pues permite la detección rápida, sencilla y separada de las toxinas A y B haciendo uso de un solo test. Tan sólo se han encontrado unos pocos ejemplares de estas cepas hasta la fecha. Investigaciones recientes muestran que cepas de *C. difficile* mutantes en el gen TcdB son capaces de seguir induciendo CDI en hámster debido a la producción de toxina A<sup>2</sup>. Estos resultados apuntan a la existencia de estas cepas en muestras clínicas.

### PRINCIPIO DEL MÉTODO

*C. difficile* toxins A+B MonlabTest utiliza una combinación de:

- 4) unas partículas de látex rojas conjugadas a un anticuerpo específico frente a la toxina A que coopera con otro anticuerpo específico para toxina A situado en la membrana, debajo de la banda de control,
- 5) otras partículas de látex rojas conjugadas a un anticuerpo específico frente a la toxina B que coopera con otro anticuerpo específico para toxina B situado en la membrana, encima de la banda de control,
- 6) partículas de látex azules conjugadas a un antígeno reconocido por un anticuerpo específico para dicho antígeno unido a la membrana conformando la llamada banda de control del test.

En primer lugar, la muestra se trata con el tampón diluyente de la muestra (incluido en este kit) para conseguir la extracción de las toxinas a partir de la matriz fecal. Tras la extracción, tan sólo se necesita añadir un volumen determinado de sobrenadante en la tira reactiva y esperar 15 minutos.

Cuando la muestra extraída fluye a través de la membrana del test, las partículas coloreadas migran. En el caso de una muestra positiva, los anticuerpos específicos presentes en la membrana capturarán las partículas coloreadas recubiertas por el antígeno.

Diferentes líneas de color serán visibles, dependiendo del contenido de toxinas en la muestra. Estas líneas se usan para interpretar el resultado a los 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (ver Fig.1)

MATERIAL SUMINISTRADO	MATERIAL NECESARIO PERO NO PROPORCIONADO
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 casetes</li> <li>- 20 viales con diluyente (1,5mL)</li> <li>- Pipetas de plástico desechables</li> <li>- Instrucciones de uso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vórtex</li> <li>- Cronómetro</li> </ul>

### PRECAUCIONES

1. Las muestras de los pacientes (heces) deben ser manipuladas con cuidado ya que pueden contener agentes infecciosos. A lo largo de todo el proceso se deben usar todos los medios de protección requeridos.
2. El tampón de dilución de la muestra contiene azida de sodio como agente antimicrobiano. Evitar el contacto directo con la piel y las mucosas. Desechar de forma apropiada. No usar el tampón si manifiesta indicios de contaminación o precipitación.
3. No comer, beber, fumar, almacenar o preparar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.
4. Cuando se finaliza el trabajo, desechar los guantes y, a continuación, en primer lugar, limpiar las manos con desinfectantes alcohólicos. En segundo lugar, lavar las manos con jabón. Finalmente, descontaminar el fregadero con desinfectantes esporocídicos ya que las esporas de *C. difficile* no se eliminan con alcohol.
5. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
6. En el caso de almacenar el test refrigerado, dejar que todos los componentes del kit y las muestras fecales alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras frías pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomienda de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.
7. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
8. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
9. En caso de rotura del envase primario (sobre de aluminio o vial) el producto no debe ser utilizado, aunque ninguno de los componentes haya sido dañado.
10. Es muy importante añadir el volumen correcto de muestra extraída al dispositivo de reacción. Si es inferior al indicado, puede ser que no se realice la cromatografía porque no llegue suficiente muestra a la zona de reacción; si es superior, pueden aparecer líneas marrones en vez de rojas o azules.
11. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
12. No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.
13. Es muy importante tomar la cantidad adecuada de muestra: unos **110 mg** si son **muestras sólidas (una bolita pequeña de unos 5 mm de diámetro)**, una cantidad capaz de cubrir las estrías del palito unido al tapón del vial si son **muestras semi-líquidas** (no se pueden tomar con la pipeta) y **110 µl** si son **muestras líquidas (4 gotas)** si se emplean las pipetas desechables proporcionadas con el kit; estas cantidades se extraen en el tampón de dilución de la muestra suministrado en los viales incluidos en el kit. Un exceso de muestra con respecto a la indicada podría impedir que la cromatografía transcurra de forma correcta; esto es especialmente crítico en el caso de muestras sólidas ya que no es tan sencillo tomar la cantidad recomendada de muestra.
14. No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información esencial respecto al marcado CE del producto y lotificación.

### CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El kit *C. difficile* toxins A+B MonlabTest se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre +2 y +30°C.

Su fecha de caducidad está impresa en los tubos o en los envoltorios de aluminio.

### MUESTRAS

- Este test está diseñado para analizar muestras fecales líquidas o semi-líquidas; pueden analizarse muestras sólidas, aunque no es lo habitual teniendo en cuenta que la diarrea es un síntoma inherente a la infección por *C. difficile*.
- No usar muestras que hayan sido recogidas en medios de transporte o se les hayan añadido agentes de conservación (como formalina, SAF, PVA o similares) o medios de enriquecimiento pues su presencia podría interferir con la correcta ejecución del test.
- Se recomienda analizar muestras frescas sin tratar. Si se tienen que conservar durante un tiempo, pueden guardarse en el frigorífico (+2-8°C) durante 1 o 2 días. Para tiempos más largos, deben congelarse a -20°C teniendo en cuenta que algunas muestras se vuelven negativas tras haber sido congeladas.
- Prestar especial atención cuando se analicen muestras hemorrágicas pues suelen dar problemas de inespecificidad cuando el contenido en sangre es elevado. Un indicio de esta inestabilización del test suele ser la alteración del color azul de la banda de control (tiende a mostrar un color morado o azul muy oscuro).
- En caso de congelación, descongelar totalmente las muestras a temperatura ambiente antes de proceder a su análisis.
- Evitar ciclos de congelación y descongelación con las muestras fecales ya que las toxinas pueden perder su integridad.



## PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS FECALES

**Nota General:** usar todos los medios de protección requeridos a lo largo del desarrollo del test debido al manejo de muestras infecciosas. Una vez finalizado el trabajo, proceder con la higiene de acuerdo al punto 4 del apartado "Precauciones".

Este tampón es el mismo que se utiliza para el producto MO-076012 C. *DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest.

El protocolo de preparación de las muestras fecales es el siguiente:

1. Homogeneizar previamente la muestra con el fin de que sea lo más representativa posible.
2. Desenroscar el tapón del vial con cuidado de no derramar el tampón de dilución. Si las heces son **sólidas**, tomar con el palito unido al tapón del vial una cantidad aproximada de **110 mg** de heces (una pequeña porción de **5 mm de diámetro**). Si las heces son **semi-líquidas** (no se pueden tomar con la pipeta), tomar una cantidad de muestra de manera que **cubra** por completo las **estrías del palito** unido al tapón del vial. Si las heces son **líquidas**, tomar con ayuda de una pipeta **110 µl (4 gotas)** si se emplean las pipetas desechables incluidas en el kit).
3. Añadir cuidadosamente la muestra en el vial con el tampón de dilución. Enroscar bien el tapón y agitar vigorosamente para asegurar una mezcla homogénea.

### PROCEDIMIENTO

1. Sacar el dispositivo de reacción de la bolsa de aluminio. Desechar la bolsita de desecante puesto que sólo sirve para preservar el test de la humedad.
2. Invertir el vial y añadir **3 gotas** en la zona de adición de muestra (ventana circular señalada con una flecha).
3. Esperar exactamente **15 minutos** para leer e interpretar el resultado.

### LECTURA E INTERPRETACIÓN

Las cinco tiras que se muestran en la Fig. 1 son un ejemplo de los distintos resultados que se pueden obtener con *C. difficile* toxins A+B MonlabTest. Se distinguen tres bandas coloreadas diferentes:

- **Banda azul:** constituye la banda de control que indica un correcto funcionamiento del test.
- **Banda roja superior:** indica presencia de TcdB en la muestra.
- **Banda roja inferior:** indica presencia de TcdA en la muestra.

La banda azul de control debe aparecer siempre. La presencia adicional de cualquiera de las dos bandas rojas indica la presencia de *C. difficile* productor de TcdA y/o TcdB en la muestra analizada.

- **Tira 1:** resultado NEGATIVO: la muestra no contiene *C. difficile* o contiene una cepa no productora de TcdA / TcdB. Sólo aparece una línea transversal **AZUL** en la zona central del dispositivo de reacción alineada con la letra "C" marcada en la carcasa. Esta banda constituye la banda de control y debe aparecer siempre ya que indica que la cromatografía transcurre con normalidad.

- **Tiras 2-4:** resultados POSITIVOS:

- **Tira 2:** Detección de TcdA: aparece una banda **AZUL** (control) y una banda **ROJA** justo por debajo de la banda de control alineada con la letra "T1" marcada en la carcasa. La intensidad depende de la concentración de toxina A en la muestra.
- **Tira 3:** Detección de TcdB: aparece una banda **AZUL** (control) y una banda **ROJA** justo por encima de la banda de control alineada con la letra "T2" marcada en la carcasa. La intensidad depende de la concentración de toxina B en la muestra.
- **Tira 4:** Detección de TcdA y TcdB aparece una banda **AZUL** (control) junto a dos bandas **ROJAS** (una por encima (TcdB) y otra por debajo (TcdA) de la banda de control).

- **Tira 5:** resultados INVÁLIDOS: no aparece la banda de control azul, el color azul de la banda de control aparece claramente alterado (azul muy oscuro o morado) o aparecen colores inespecíficos en las bandas positivas (diferentes al rojo). En general, cualquier combinación de colores diferente a las indicadas en las tiras 1-4, indica un funcionamiento anómalo del test. Algunas de las causas que justifican este hecho pueden ser:

- algunos de los reactivos se han deteriorado o el test ha caducado.
- la muestra no se ha preparado de acuerdo a las instrucciones de uso.
- la muestra tiene un alto contenido en sangre.

Ante un resultado inválido, se recomienda repetir el test con una nueva tira siguiendo estrictamente las instrucciones de uso descritas en este manual. En el caso de las muestras con sangre, se aconseja el uso de una técnica alternativa pues el problema de la inestabilización no suele depender de la tira empleada sino de la propia matriz de la muestra. Otros tests rápidos comerciales dieron resultados similares con estas muestras.

Toda línea que por la naturaleza de la muestra pueda aparecer pasados los 15 minutos de reacción no tendrá valor diagnóstico.

NOTA: El diagnóstico final y definitivo sobre una CDI/PMC lo establece el médico clínico. Este test sólo detecta TcdA / TcdB en una muestra, pero no constituye un argumento para afirmar que la persona padece una CDI.

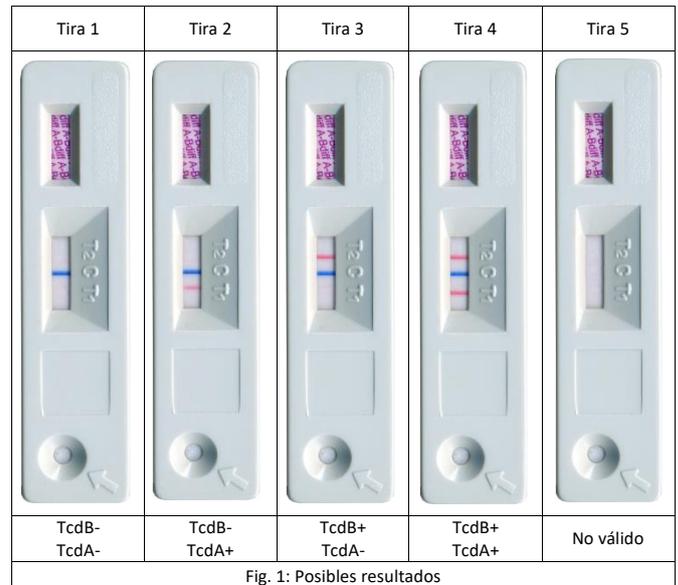


Fig. 1: Posibles resultados

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. *C. difficile* toxins A+B MonlabTest analiza heces humanas de naturaleza líquida o semi-líquida; no se excluye la medida de muestras sólidas, aunque el test no se ha optimizado para ello ya que, en ocasiones aisladas, se han observado fenómenos de secuestro de las toxinas con este tipo de matrices sólidas.
2. Este test es cualitativo, no cuantitativo aunque la intensidad de las bandas positivas están relacionadas con la cantidad de toxinas detectable en la muestra fecal.
3. Más de 200 muestras fecales fueron evaluadas para asegurar el correcto funcionamiento del test. La correlación de resultados con otras técnicas (ELISA y Citotoxicidad) fue buena. Sin embargo, este estudio no excluye posibles interferencias en el funcionamiento del test al analizar otras muestras fecales.
4. Con un defecto de muestra pueden aparecer resultados positivos muy débiles. En este caso se debe repetir el test con una cantidad mayor de muestra manteniendo la proporción recomendada con el volumen del diluyente de la muestra (ver apartado de "Preparación de las muestras").
5. Un exceso de muestra puede causar un desarrollo del test muy lento e incluso impedir el correcto desarrollo del test (no se ve la línea control). En este caso se debe repetir el test con una cantidad menor de muestra. Prestar especial atención a este punto cuando se analizan muestras sólidas.
6. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección por parte de *C. difficile* (CDI). El resultado del test debe ser interpretado en relación a los síntomas clínicos del paciente. Además, debemos tener en cuenta que las toxinas son moléculas frágiles que pueden degradarse con facilidad debido, por ejemplo, a un almacenamiento inadecuado de la muestra o la presencia de inhibidores haciendo que la concentración de toxinas esté por debajo del límite de detección del test (ver apartado "Sensibilidad Analítica").
7. Un resultado positivo obtenido con una muestra sólida debe ser interpretado con mucha precaución. En principio, la diarrea es un síntoma inherente a la infección por *C. difficile* (CDI) y una muestra sólida implica ausencia de diarrea. El operador del test debe proporcionar información de la naturaleza de la muestra al médico clínico para que, junto al historial clínico del paciente, se pueda establecer un diagnóstico lo más preciso posible.
8. Se ha observado una cierta reactividad cruzada con muestras fecales fuertemente positivas para *Entamoeba histolytica*. No ocurre así cuando se analiza un extracto puro de este parásito, sin matriz fecal. Otros ELISA y test rápidos del mercado dieron resultados similares con estas muestras.
9. Se ha observado que muestras fecales con un alto contenido en sangre interfieren negativamente con el test, pudiendo aparecer problemas de inespecificidad con muestras que son negativas para *C. difficile*. Esta inestabilización del test suele ir acompañada de una alteración en la coloración de la banda de control; en lugar de un color azul claro, aparece un color azul muy oscuro o incluso morado (ver las imágenes en el apartado "Lectura de Resultados").
10. Se han descrito índices de colonización en niños por parte de *C. difficile* de hasta el 50 %. También se dan elevados índices de colonización en pacientes con fibrosis quística. Normalmente, estos dos grupos de pacientes permanecen asintomáticos por lo que no requieren tratamiento específico. Prestar especial atención a estos resultados positivos sin relevancia clínica ya que los pacientes afectados no requieren tratamiento frente a *C. difficile*.

### SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Para determinar la sensibilidad de *C. difficile* toxins A+B MonlabTest se usaron toxinas A y B procedentes de tgc BIOMICS llegando a detectar unos niveles en torno a 0,75 ng/mL para ambas toxinas.



## SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

Los valores medios de sensibilidad y especificidad establecidos para *C. difficile* toxins A+B MonlabTest considerando todas las evaluaciones llevadas a cabo son:

Sensibilidad: 97,4 %  
Especificidad: 96,1 %

*C. difficile* toxins A+B MonlabTest muestra un excelente comportamiento con valores de sensibilidad y especificidad superiores al 95%.

A continuación, se incluyen dos de las evaluaciones realizadas con el test:

### C. Evaluación Externa:

*C. difficile* toxins A+B MonlabTest se evaluó en un hospital español analizando un total de 150 muestras negativas y 44 muestras positivas según la técnica de referencia, la Citotoxicidad. Todas las muestras del estudio fueron frescas.

Los resultados obtenidos fueron:

Sensibilidad: 92,5%  
Especificidad: 95,5%

### D. Evaluación Interna

*C. difficile* toxins A+B MonlabTest se evaluó internamente midiendo un total de 242 muestras negativas y 105 muestras positivas, caracterizadas a nivel de Citotoxicidad en los hospitales de origen. Todas las muestras analizadas fueron congeladas.

Los resultados obtenidos se indican a continuación:

Sensibilidad: 99,0%  
Especificidad: 96,3%

## REPERTIBILIDAD

Se diseñó una curva de sensibilidad haciendo uso de las toxinas A y B puras que permite establecer la sensibilidad de *C. difficile* toxins A+B MonlabTest en distintas condiciones. Cada una de las diluciones 1/2 que integran la curva se midió por triplicado, en una única sesión por la misma persona. La variación máxima de los resultados utilizando el *C. difficile* toxins A+B MonlabTest fue de una dilución 1/2, lo que indica una alta precisión intra-ensayo.

## REPRODUCIBILIDAD

**PRECISIÓN INTERDÍA:** Con un mismo lote del *C. difficile* toxins A+B MonlabTest se midió la curva de sensibilidad descrita anteriormente a lo largo de cuatro días espaciados en el tiempo. Los resultados fueron muy reproducibles (obtenemos la misma sensibilidad tanto para TcdA como para TcdB los cuatro días de medida).

**PRECISIÓN INTER-OPERADOR:** Cinco personas sin previo entrenamiento midieron por duplicado una curva de sensibilidad. Se observaron diferencias en las diluciones más fuertes de la curva (señales más débiles) que en ningún caso fueron superiores a una dilución 1/2.

**PRECISIÓN INTER-LOTE:** Con tres lotes distintos del test se midió una curva de sensibilidad por duplicado. El análisis lo realizó una única persona el mismo día. Sólo se apreciaron diferencias de una dilución 1/2, asumibles y tolerables por el ensayo realizado.

Las diferencias encontradas en los distintos apartados de "Reproducibilidad" son asumibles en una técnica inmunocromatográfica cualitativa con una variabilidad inherente a la misma.

## EFFECTO HOOK

Diversas publicaciones indican que, en el caso de las infecciones más severas por *C. difficile*, la concentración máxima de toxinas halladas en heces ronda los 112 ng/mL<sup>10</sup>. Como se quiere ver el efecto de una concentración muy elevada de toxinas, por encima de valores que se pueden encontrar entre la población, se midieron concentraciones de toxina A y de toxina B de hasta 5000 ng/mL que supone estar unas 400 veces por encima del límite de detección del test para toxina A (12,5 ng/mL), unas 1500 veces por encima del límite de detección del test para toxina B (3 ng/mL) y unas 40 veces por encima de la máxima concentración de toxinas observada en heces de pacientes. En ningún caso se observó disminución en la intensidad de las señales positivas.

## INTERFERENCIAS

Las siguientes sustancias no mostraron ningún efecto en los resultados del test cuando fueron añadidas a muestras fecales (positivas y negativas) a las concentraciones indicadas en la siguiente tabla:

Racemadotrilol	5% (p/v)	Ibuprofeno	20% (p/v)
Cimetidina	10% (p/v)	Ac. Acetilsalicílico	30% (p/v)
Loperamida	5% (p/v)	Edulcorante	5% (p/v)
Metronidazol	10% (p/v)	Ac. palmítico	40% (p/v)
Omeprazol	3% (p/v)	Sulfato de Bario	5% (p/v)
Ampicilina	15% (p/v)	Mucina	5% (p/v)

## REACTIVIDAD CRUZADA

Este estudio se desarrolló en dos centros diferentes:

▪ **MONLAB:** *C. difficile* toxins A+B MonlabTest se testó frente a heces fuertemente positivas para los siguientes microorganismos: Adenovirus - Rotavirus - Norovirus - Astrovirus - *Helicobacter pylori* - *Entamoeba histolytica* - *Giardia lamblia* - *Cryptosporidium parvum*.

Se observó una cierta reactividad cruzada con muestras fecales fuertemente positivas para *Entamoeba histolytica* (ver punto 8 en apartado "Limitaciones del Procedimiento").

▪ **CENTRO HOSPITALARIO NACIONAL (España):** *C. difficile* toxins A+B MonlabTest se testó frente a distintos microorganismos susceptibles de estar presentes en el tracto intestinal en un momento dado a una concentración suficientemente elevada. Los exámenes fueron realizados con suspensiones de bacterias a una concentración de 108 cfu/mL. *C. difficile* toxins A+B MonlabTest no presentó reactividad cruzada con ninguno de los microorganismos indicados a continuación:

*Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spp*, *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli 1*, *Escherichia coli 2*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossyeri*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexnerii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lyras O, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN and Rood JI. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature. Apr 2009, Vol: 458(7242) pp: 1176-1179.
2. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A and Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature. Oct 2010, Vol: 467(7316) pp: 711-713.
3. Vonberg RP, Reichardt C, Behne M, Schwab F, Zindler S and Gastmeier P. Costs of nosocomial *Clostridium difficile* associated diarrhoea. J Hosp Infect. Sep 2008, Vol: 70(1) pp: 15-20.
4. Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I, Lyerly DM, Popoff MR, Rood JI, Sonenshein AL, Thelestam M, Wren BW, Wilkins TD and von Eichel-Streiber C. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. J Med Microbiol. Feb 2005, Vol: 54(Pt 2) pp: 113-117.
5. Tucker KD, Carrig PE and Wilkins TD. Toxin A of *Clostridium difficile* is a potent cytotoxin. J Clin Microbiol. May 1990, Vol: 28(5) pp: 869-871.
6. Soehn F, Wagenknecht-Wiesner A, Leukel P, Kohl M, Weidmann M, van Eichel-Streiber C and Braun V. Genetic rearrangements in the pathogenicity locus of *Clostridium difficile* strain 8864-implications for transcription, expression and enzymatic activity of toxins A and B. Mol Gen Genet. May 1998, Vol: 258(3) pp: 222-232.
7. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E and Poxton I. European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect. Nov 2007, Vol: 13(11) pp: 1048-1057.
8. Depitre C, Delmee M, Avesani V, L'Haridon R, Roels A, Popoff M and Corthier G. Serogroup F strains of *Clostridium difficile* produce toxin B but not toxin A J Med Microbiol. Jun 1993, Vol: 38(6) pp: 434-441.
9. Drudy D, Harnedy N, Fanning S, Hannan M and Kyne L. Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. Infect Control Hosp Epidemiol. Aug 2007, Vol: 28(8) pp: 932-940.
10. Alex B. Ryder, Ying Huang, Haijing Li, Min Zheng, Xiaobo Wang, Charles W. Stratton, Xiao Xu and Yi-Wei Tang. Assessment of *Clostridium difficile* infections by quantitative detection of TcdB toxin by use of a real-time cell analysis system. Journal of Clinical Microbiology, Nov 2010, pp: 4129-4134.

## PRESENTACIÓN SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD

	Fabricante		Uso de diagnóstico <i>in vitro</i>
	No reutilizar		Consultar las instrucciones de uso
	Contiene suficiente para <n> ensayos		Mantener seco
	Código		Límite de temperatura
	Número de lote		Fecha de caducidad
	Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i>		Tampón de dilución

